

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590479

研究課題名（和文） HLA アリル多型性と T 細胞の抗ウイルス機能

研究課題名（英文） Effects of HLA alleles on antiviral activity of T cells

研究代表者

上野 貴将（UENO TAKAMASA）

熊本大学・エイズ学研究センター・准教授

研究者番号：10322314

研究成果の概要：

HIV などヒトに慢性疾患を引き起こすウイルス感染症では、病態の進行が HLA アリルのハプロタイプと相関するが、その要因は明らかになっていない。本研究では、HLA アリル多型性が T 細胞の抗ウイルス機能に与える役割と、ウイルス因子が獲得免疫応答に及ぼす影響を解析した。その結果、HIV に対する CTL 免疫監視システムは、HIV-1 病原性因子である Nef の機能に著しい影響を与えること、抗原ペプチド・MHC 複合体の安定性が、TCR による抗原認識を通じて、HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性に大きく影響すること、の二点を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ウイルス学

キーワード：ワクチン、HLA、細胞傷害性 T 細胞、HIV

1. 研究開始当初の背景

HIV や HCV などヒトに慢性疾患を引き起こすウイルス感染症では、病態進行や遅延が HLA アリルのハプロタイプと相関する。このことは、各 HLA 分子が拘束する T 細胞応答が、ウイルス由来因子と HLA 分子との相互作用を通じて、慢性ウイルス疾患制御に深く関わることを示唆するが、その全貌は明らかになっていない。しかしながら、HLA アリル多型性は非常に大きく、この問題に正面からアプローチすることは不可能に近い。そこである一つの HLA アリルグループに着目した。HLA クラ

ス I アリルは、その結合ペプチドに共通モチーフを有する HLA supertype に分類される。HLA-B7 supertype は、抗原ペプチドの 2 番目のアミノ酸にプロリンを好む一群の HLA アリルで、HLA-B7, B35, B51, B53 などが含まれる。我々は以前、HIV 由来の同一の抗原ペプチドが複数の HLA-B7 supertype に提示され、同一の TCR によって交差認識されることから、HLA-B7 supertype 内の共通した構造が TCR の認識に関与することを明らかとした。その一方で HIV 感染症との相関は HLA-B7 supertype メンバー内で大きく異なり、HLA-B35 と B53

は早期進行と、HLA-B51 は病態遅延と関連する。このことから、HLA-B7 supertype 内に固有の何らかの微小な相違が、ウイルス因子と抗原提示システムを通じて CTL の抗ウイルス疾患制御機能に影響すると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、HLA アリル多型性が抗原提示システムとして T 細胞の抗ウイルス機能に与える役割を明らかとするとともに、このシステムにウイルス因子が及ぼす影響の解明を目指す。具体的には HIV 感染症とその病態に大きな影響を与える一群の HLA アリル (HLA-B7 supertype) をモデルとして、HIV に感染した CD4 T 細胞の HLA・抗原ペプチド複合体の量と T 細胞の細胞傷害活性の関係を解析するとともに、Nef などのウイルス因子が T 細胞の抗ウイルス活性に与える影響を経時的、定量的に明らかにする。HLA アリル多型性とウイルス因子の相互作用が抗ウイルス獲得免疫応答に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

さまざまな病態にある HIV 感染者 (表 1) から提供していただいた血液検体 (国立国際医療センター・岡先生および瀧永先生の協力の下) を用いて、HIV 抗原に対して特異的な CTL クローンを樹立した。さらに T 細胞レセプター (TCR) 遺伝子をクローニングして、TCR が欠損した T 細胞に遺伝子導入し、抗原ペプチド、HLA クラス I および TCR の相互作用を詳細に解析した。HIV 感染者の HLA クラス I 遺伝子タイピングを行なって (HLA 研究所)、HLA-B35 を持つ検体のみを用いた。また、ペプチド・HLA クラス I 複合体は、大腸菌で生産した組換え蛋白質をリフォールディング後、クロマトグラフィーを組み合わせで精製した。

4. 研究成果

(1) CTL 免疫淘汰圧が Nef と HIV 複製に与える影響

HLA-B35 拘束性の HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性を解析するとともに、そうした CTL による免疫淘汰圧が HIV の複製に与える影響について解析した。その結果、以下の 3 点を明らかにした。

極めて保存性の高い Nef の機能性領域に、稀 (データベース上で約 5%) に認められる変異は、HLA-B35 を持つ HIV 感染者で非常に多く (ほぼ 90%) 認められた。さらに HIV 感染者から樹立した CTL の機能解析から、この変異は HLA-B35 拘束性 CTL 応答によって選択される CTL 逃避変異であることが明らかとなった。

この変異を含む領域は、PxxP 領域と呼ばれ、

Nef のさまざまな機能を担うと考えられている。まず Nef による CD4 分子および HLA クラス I 分子の発現低下作用を解析した。その結果、この CTL 変異は、CD4 分子の発現低下には影響しないが、HLA クラス I 発現低下機能を減弱させた。さらにこのことにより、変異ウイルスに感染した細胞は、他の CTL (Gag, Pol, Env などに特異的な) に対して、より殺されやすくなることが分かった。これらの結果は、Nef 上に認められた CTL 逃避変異は、生体内ではウイルス複製にネガティブに働くと考えられた。

さらに、この Nef 変異を持つウイルスは、試験管内でウイルス複製機能が弱まっていることから、この変異は Nef のウイルス複製増強作用を減弱すると示唆された。以上のことから、HIV に対する CTL 免疫監視システムは、Nef の病原性機能に著しい影響を与えることが明らかになった。

(2) 抗原ペプチドの内在的性質が CTL 抗ウイルス活性に与える影響

HLA-B35 拘束性の 2 つの Nef エピトープに対する HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性を解析するとともに、抗ウイルス活性の違いをもたらす要因について検討した。その結果、以下の 3 点を明らかにした。

感染早期に主要な応答を示した VY8 エピトープに特異的な CTL の抗ウイルス活性は非常に強く、慢性期に主要な RY11 エピトープに特異的な CTL の抗ウイルス活性は弱かった。それぞれのエピトープに特異的な CTL から T 細胞レセプター (TCR) をクローニングし、TCR を再構築して、TCR と抗原ペプチドの相互作用を解析したが、エピトープ間で大きな違いは見いだせなかった。

一方、HLA クラス I 分子からのエピトープペプチドの解離を調べたところ、エピトープ間で大きな違いが認められた。VY8 エピトープの方が HLA クラス I 分子からの解離が顕著に遅く、非常に安定な複合体を形成していることが分かった。

このように、ペプチド配列が重複する良く似た 2 つの抗原ペプチドに対する CTL 応答を解析することにより、ペプチド・MHC 複合体の安定性が、TCR による抗原認識を通じて、HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性に大きく影響することが明らかとなった。

表1 Summary of HLA-B35* subjects used in this study

Pts	HLA class I allele	Months since seroconversion	Viral load (log10/ml)	CD4 (mm ³)	Antiretroviral therapy	Nef sequence	PBMC
							availability
001	A2402/A2603, B3501/B4002	132	ND	227	+	RPQVPLRPMTF	-
		192	3.9	223	+	FPQVPLRPMTY	+
003	A2402/A2601, B3501/B5101	72	ND	480	-	RPQVPLRPMTF	-
		144	ND	252	+	FPQVPLRPMTY	+
006	A24/A26, B35/B52	48	ND	102	+	RPQVPLRPMTF	-
015	A11/A24, B35/B54	147	BD	383	+	FPQVPLRPMTY	+
016	A26/A33, B35/B44	7	ND	43	-	RPQVPLRPMTF	-
017	A2/A24, B35/B48	192	BD	254	+	FPQVPLRPMTY	-
019	A2402/-, B3501/B5201	18	4.7	524	-	RPQVPLRPMTF	-
		80	BD	1574	+	FPQVPLRPMTY	+
025	A24/A31, B35	26	ND	50	+	FPQVPLRPMTY	-
027	A24/A26, B35/B44	4	ND	84	+	RPQVPLRPMTF	-
033	A0207/A3101, B3501/B4601	72	5.3	326	-	FPQVPLRPMTY	+
034	A2402/A2601, B3501/B4801	48	4.4	201	-	FPQVPLRPMTY	+
042	A24/A31, B35/B60	59	3.8	311	-	FPQVPLRPMTY	+
046	A2, B35/B61	48	BD	263	+	FPQVPLRPMTY	+
099	A2402/-, B3501/B61	12	3.9	984	-	RPQVPLRPMTF	+
100	A2601/-, B3501/B4001	16	5.0	614	-	RPQVPLRPMTF	+
102	A2402/A0206, B3501/B0702	17	2.8	482	-	RPQVPLRPMTF	+
131	A2402/A0207, B3501/B4601	10	1.9	563	+	RPQVPLRPMTF	+
136	A2402/A2601, B3501/B5201	15	4.4	308	-	RPQVPLRPMTF	+
141	A0201/A3101, B3501/B5401	10	5.3	382	-	RPQVPLRPMTY	+
		20	5.1	360	+	RPQVPLRPMTF	+
145	A0207/A2601, B3501/B5101	6	BD	645	-	RPQVPLRPMTY	-
		18	4.6	685	-	RPQVPLRPMTF	+
161	A2402/A2601, B3501/B5401	13	2.3	955	-	RPQVPLRPMTF	+
168	A2601/-, B3501/-	5	2.3	408	+	RPQVPLRPMTY	+
178	A2601/A3101, B3501/B4601	8	2.7	568	+	RPQVPLRPMTY	+

ND, not determined; BD, below detection limit

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Chihiro Motozono, Saeko Yanaka, Kouhei Tsumoto, Masafumi Takiguchi, Takamasa Ueno (2009) Impact of intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes on antiviral activity of HIV-specific CTL. *Journal of Immunology* 182, 5528-5536 査読有
2. Takamasa Ueno, Chihiro Motozono, Sachi Dohki, Philip Mwimanzi, Susanne Rauch, Oliver T. Fackler, Shinichi, Oka, Masafumi Takiguchi (2008) CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. *Journal of Immunology* 180, 1107-1116 査読有
3. Tetsuo Tsukamoto, Sachi Dohki, Takamasa Ueno, Miki Kawada, Akiko Takeda, Michio Yasunami, Taeko Naruse, Akinori Kimura, Masafumi Takiguchi,

and Tetsuro Matano (2008) Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241-249 epitope. *AIDS* 22, 993-994 査読有

4. Takamasa Ueno, Yuka Idegami, Chihiro Motozono, Shinichi, Oka, Masafumi Takiguchi (2007) Altering effects of antigenic variations in HIV-1 on antiviral effectiveness of HIV-specific CTLs. *Journal of Immunology* 178, 5513-5523 査読有

[学会発表](計20件)

1. C. Motozono, S. Yanaka, K. Tsumoto, M. Takiguchi, Takamasa Ueno: Antiviral activity of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes is influenced by intrinsic cooperative thermodynamics of peptide-MHC complexes. Keystone Symposium –HIV immunobiology: From Infection to Immune Control, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA, March 22-27, 2009
2. Philip Mwimanzi, M. Fujiwara, M. Takiguchi, Takamasa Ueno: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages. Keystone Symposium –HIV immunobiology: From Infection to Immune Control, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA, March 22-27, 2009
3. Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, and Takamasa Ueno, The effect of TCR-peptide-MHC interactions on antiviral activity and cross-reactive capacity of HIV-specific CTLs,

- Keystone Symposia -HIV Pathogenesis-, Banff, Canada March27-April1, 2008
4. **Takamasa Ueno**, Chihiro Motozono, Sachi Douki, Susanne Rauch, Philip Mwimanzzi, Oliver T. Fackler, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi, CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, XVII International AIDS Conference, Mexico City, Aug 4-9, 2008
 5. Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, **Takamasa Ueno**, The decay of peptide-MHC complex influences antiviral activity of HIV-specific CTLs. 9th AIDS Seminar in KUMAMOTO (Kumamoto, Japan) September18-19, 2008
 6. Philip Mwimanzzi, Mamoru Fujiwara, Masafumi Takiguchi, **Takamasa Ueno**: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages. 9th AIDS Seminar in KUMAMOTO (Kumamoto, Japan) September18-19, 2008
 7. **Takamasa Ueno**, The balance of power: Nef and CTL. 9th AIDS Seminar in KUMAMOTO (Kumamoto, Japan) September 18-19, 2008
 8. 本園 千尋、滝口 雅文、**上野 貴将**: HIV 特異的 T 細胞の抗原特異性と抗原変異に対する交差反応性、一般口演「レンチウイルス、HIV(7)」第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山コンベンションセンター、2008 年 10 月 26 - 28 日
 9. 本園 千尋、滝口 雅文、**上野 貴将**: 抗原ペプチド複合体の内在的安定性は CTL の抗ウイルス活性に影響する、一般口演「0-37) 免疫」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日 - 28 日
 10. **上野 貴将**: ヒト免疫監視システムと HIV の適応馴化 シンポジウム「ヒトはなぜエイズになるのか」第 22 回日本エイズ学会学術集会 2008 年 11 月 26 日 ~ 28 日 大阪国際交流センター
 11. 本園 千尋、滝口 雅文、**上野 貴将**: 抗原ペプチド・MHC 複合体の安定性は T 細胞の抗ウイルス機能に影響する、ワークショップ「ウイルス感染-2」第 38 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館、2008 年 12 月 1 日 - 3 日
 12. Mwimanzzi Philip、藤原 守、滝口 雅文、**上野 貴将**: The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef 's pathogenic functions in primary macrophages、一般口演「0-35) アクセサリー」第 22 回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪国際交流センター、2008 年 11 月 26 日 - 28 日
 13. **Takamasa Ueno**, Chihiro Motozono, Sachi Douki, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi, CTL-mediated selective pressure modulates pathogenic functions of HIV-1 Nef, Keystone Symposia-Molecular and Cellular Determinants of HIV Pathogenesis-(Whistler,Canada) March 25-30, 2007
 14. **Takamasa Ueno**, Chihiro Motozono, Sachi Douki, Susanne Rauch, Philip Mwimanzzi, Oliver T. Fackler, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi, CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, AIDS Vaccine 07, Seattle, USA, Aug 20-23, 2007
 15. **Takamasa Ueno**, The impact of

- CTL-mediated selective forces on pathogenic functions of HIV-1 Nef, Center for AIDS Research, Kumamoto University, 10th Anniversary Symposium (Kumamoto, Japan) November 15-16, 2007
16. Chihiro Motozono, Masafumi Takiguchi, **Takamasa Ueno**, The capacity of antigenic peptides that dictates antiviral activity of Cytotoxic T Lymphocytes, 8th AIDS Seminar in KUMAMOTO(Kumamoto, Japan) September 13-14, 2007
17. Koizumi, H., Iwatani, T., Hachiya, A., Kawashima, Y., **Ueno, T.**, Oka, S. and Takiguchi, M., Ability of HIV-1-specific CTL to suppress HIV-1 replication and selection of escape mutants in chronically HIV-1-infected individuals, 8th AIDS Seminar in KUMAMOTO(Kumamoto, Japan) September 13-14, 2007
18. **Takamasa Ueno**, Chihiro Motozono, Sachi Douki, Susanne Rauch, Philip Mwimanzzi, Oliver T. Fackler, Shinichi Oka, Masafumi Takiguchi, CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef, 8th AIDS Seminar in KUMAMOTO(Kumamoto, Japan) September 13-14, 2007
19. **上野貴将**、本園千尋、道木佐知、岡慎一、滝口雅文：HIV Nef の病原性機能維持と宿主免疫淘汰圧 ワークショップ 第 55 回日本ウイルス学会 学術集会 2007.10.21-23 札幌コンベンションセンター
20. **上野貴将**、本園千尋、道木佐知、Philip

Mwimanzzi、岡 慎一、滝口雅文：CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef. ワークショップ 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007.11.20 高輪プリンスホテル

〔図書〕(計 2 件)

1. **上野貴将** (2007) RI の逆襲：アイソトープのヒト免疫研究への活用 細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 秀潤社, p62-68
2. **上野貴将**、本園千尋 (2008) HIV 感染症-宿主側の防衛因子の役割-「HIV コントロールにおける CTL の役割」血液フロンティア (医薬ジャーナル社) 18(5), p725-731

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

1. 発明の名称：T 細胞受容体を模倣する抗体断片及びその製造方法 発明者：熊谷泉、梅津光央、渡邊秀樹、上野貴将、本園千尋 権利者：同上 特願 2008-135007 出願日：2008 年 5 月 23 日 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 貴将 (UENO TAKAMASA)
熊本大学・エイズ学研究センター・准教授
研究者番号：10322314

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。